

## ПОЛУЧЕНИЕ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СРЕДСТВ

УДК 577.181.7

### СИНТЕЗ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОСУЛЬФИНАТОВ – АНАЛОГОВ АЛЛИЦИНА

© 2024 г. В. М. Пучков<sup>а</sup>, А. Д. Лыфенко<sup>а</sup>, В. С. Коваль<sup>а</sup>,  
С. В. Ревтович<sup>а</sup>, В. В. Куликова<sup>а</sup>, Н. В. Ануфриева<sup>а</sup>,  
А. С. Земская<sup>а</sup>, Е. А. Морозова<sup>а, \*</sup>, П. Н. Сольев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: [elmorozova@yahoo.com](mailto:elmorozova@yahoo.com)

Поступила в редакцию 17.04.2024 г.

После доработки 13.06.2024 г.

Принята к публикации 18.06.2024 г.

Диаллилтиосульфид (аллицин) эффективно подавляет рост различных микроорганизмов, в том числе штаммов, устойчивых к антибиотикам, поэтому его можно рассматривать как противомикробное соединение широкого спектра действия. Однако нестабильность аллицина в кровотоке препятствует его применению в качестве терапевтического средства. Нами синтезирован ряд аналогов аллицина, как природных, так и синтетических, и оценена *in vitro* их противомикробная активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Показано, что синтезированные соединения проявляют более выраженную противогрибковую активность, чем антибактериальную. Среди полученных соединений синтетический ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты эффективно подавлял рост как грибов, так и бактерий в концентрациях, сравнимых с известными противомикробными средствами, используемыми в медицинской практике.

**Ключевые слова:** аллицин, тиосульфиды, противомикробная активность, полимикробная инфекция, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*

**DOI:** 10.31857/S0026898424060074, **EDN:** HMWWS

#### ВВЕДЕНИЕ

Полимикробные инфекции, вызываемые сочетаниями бактерий, вирусов и грибов, все чаще усугубляют тяжесть течения заболеваний и ухудшают прогнозы выздоровления пациентов. Многие из этих полимикробных взаимодействий происходят внутри биопленок, которые образуются на естественных или искусственных поверхностях (имплантированных медицинских устройствах) и внутри организма человека [1] и ответственны за ~80% микробных инфекций у людей [2]. По сравнению с одновидовыми биопленками полимикробные часто обеспечивают специфические преимущества для каждого вида патогена [3]. Появление метициллинрезистентного золотистого стафилококка (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) и его способность к образованию биопленки стали серьезной проблемой здравоохранения

в последние десятилетия [4, 5]. В организме хозяина бактерии *S. aureus* сосуществуют с различными патогенами, включая дрожжеподобные грибы *Candida albicans* [6]. Бактерия *S. aureus* признана третьим по частоте видом, изолируемым совместно с *C. albicans* при многих заболеваниях, таких как пародонтит, стоматит, муковисцидоз, кератит, ассоциированная с искусственной вентиляцией легких пневмония, а также инфекции мочевыводящих путей и ожоговых ран [7]. Растущее использование имплантированных медицинских устройств – еще одна причина неуклонного роста частоты кандидозной и стафилококковой инфекций. Эти патогены эффективно формируют полимикробные биопленки на медицинских имплантатах [8]. Взаимодействие *S. aureus* и *C. albicans* сопровождается синергетическим эффектом в формировании биопленок и способствует возникновению антибиотикорезистентности у *S. aureus* [9].

Сокращения: МПК – минимальная подавляющая концентрация; MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) – метициллинрезистентный золотистый стафилококк.

Существующие противогрибковые и антибактериальные препараты в концентрациях, эффективных против планктонных клеток *C. albicans* и *S. aureus*, далеко не всегда “работают” против этих клеток в биопленках [10]. Увеличение терапевтических доз может иметь положительный эффект, но часто вызывает серьезные побочные эффекты (повреждение почек или печени), поэтому поиск новых противомикробных препаратов продолжает оставаться актуальной проблемой современной медицины.

Диаллилтиосульфид (алицин) образуется в растениях рода *Allium* в результате реакции β-элиминирования сульфоксида *S*-аллил-L-цистеина (алиина), катализируемой пиридоксаль-5'-фосфатзависимым ферментом алииназой (КФ 4.4.1.4), и обладает антимикробным действием, в том числе по отношению к MRSA [11, 12]. Противомикробный эффект алицина обусловлен его способностью быстро реагировать с серосодержащими белками клетки благодаря присутствию в его структуре тиосульфидной группы [13]. В отличие от большинства антибиотиков, применяемых в клинике, мишенью алицина в клетке не является конкретный белок, поэтому развитие резистентности к нему маловероятно. Диалкилтиосульфиды – аналоги алицина с насыщенной углеводородной боковой цепью (диметилтиосульфид, диэтилтиосульфид, дипропилтиосульфид) – более стабильны по сравнению с алицином [14] и проявляют аналогичный механизм антимикробного действия [15]. В связи с тем, что диалкилтиосульфиды проявляют как антибактериальную, так и противогрибковую активность [14, 16, 17], получение новых синтетических производных сульфидов и изучение их противомикробных свойств – важное направление в разработке средств для борьбы с полимикробными биопленками.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** Диметилдисульфид, диэтилдисульфид, дипропилдисульфид, трифторэтанол, трихлорэтанол, *мета*-хлорпербензойная кислота (*m*-СВРА, >77%) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%-ный водный раствор) были приобретены у “Sigma-Aldrich” (США). Сульфат натрия, гидрокарбонат натрия, оксид фосфора, уксусная кислота, серная кислота, метанол, хлористый метилен, дитиодипропионовая кислота, *n*-гексан, этилацетат были приобретены в компании “РусХим” (Россия). Все вышеперечисленные реактивы имели чистоту не менее 98% и использованы в реакциях без дополнительной очистки. Среда RPMI-1640, 3-(*N*-морфолино)пропансульфоновая кислота (MOPS, > 99.5%) приобретены в компании “ПанЭко” (Россия). Агар и бульон Мюллера-Хинтон – производства

“HiMedia” (Индия); YPD-агар и вторичный фармацевтический стандарт флуконазола приобретены у “Sigma-Aldrich”; ванкомицин из *Amycolatopsis orientalis* – аптечный препарат (“Синтез”, Россия). Тонкослойную хроматографию (ТСХ) выполняли на пластинках TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub> (“Merck”, Германия).

**Спектральный анализ.** <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C (с подавлением C–H взаимодействия) ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Bruker Avance III (“Bruker BioSpin GmbH”, Германия) с частотой 300 МГц для <sup>1</sup>H и 75.5 МГц для <sup>13</sup>C ядер в ДМСО-*d*<sub>6</sub>, если не указано иное. Химические сдвиги указаны относительно остаточного сигнала для ДМСО-*d*<sub>6</sub>: δ 2.50 м.д. для <sup>1</sup>H ЯМР и 39.52 м.д. для <sup>13</sup>C ЯМР – в качестве внутреннего стандарта; константы спин-спинового взаимодействия (*J*) указаны в герцах (Гц). Дополнительно для продукта **2h** регистрировали <sup>19</sup>F и <sup>13</sup>C (с подавлением C–H взаимодействия) ЯМР-спектры на спектрометре Q. One AS600 (“Q. One Americas”, США) с частотой 150.7 МГц для <sup>13</sup>C-ядер и 563.9 МГц для <sup>19</sup>F-ядер в ДМСО-*d*<sub>6</sub>.

ИК-спектры регистрировали на спектрометре Bruker ALPHA (“Bruker BioSpin GmbH”) в тонком слое между пластинами KBr, в области 4000–400 см<sup>-1</sup> (16 сканов, разрешение 2 см<sup>-1</sup>).

Оптическую плотность культур микроорганизмов измеряли на спектрофотометре Varian Cary-50 (“Varian”, США) и микропланшетном фотометре iMark (“Bio-Rad”, США).

**Клеточные культуры.** Штаммы *C. albicans* ATCC10231 и *S. aureus* ATCC29213 и ATCC43300 (устойчивый к метициллину) были получены из американской коллекции типовых культур (“ATCC”, США). Субкультивирование и приготовление инокулятов проводили в соответствии с рекомендованными Институтом клинических и лабораторных стандартов (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI) методами M27-A3 (для культур грибов) и M7-A11 (для бактериальных культур) при температуре инкубации 35°C и 37°C соответственно [18, 19]. Стоковые концентрации клеток *C. albicans* и *S. aureus* составляли 1 × 10<sup>6</sup> и 1 × 10<sup>8</sup> клеток/мл соответственно. Рабочую суспензию *C. albicans* (5.0 × 10<sup>2</sup> клеток/мл) готовили путем двухступенчатого разведения стоковой концентрации средой RPMI-1640. Рабочую суспензию *S. aureus* (1.0 × 10<sup>6</sup> клеток/мл) готовили разведением стоковой концентрации средой Мюллера-Хинтон.

**Синтез эфиров 3,3'-дитиодипропионовой кислоты.** Диметилловый эфир дитиодипропионовой кислоты (соединение **1g**). Раствор дитиодипропионовой кислоты (500 мг, 2.38 ммоль) в 15 мл

метанола и 100 мкл серной кислоты кипятили в течение 48 ч. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе гексан–этилацетат (4 : 1). По окончании реакции в смесь вносили насыщенный раствор гидрокарбоната натрия до рН 8.0 и упаривали. Остаток растворяли в смеси вода–этилацетат и экстрагировали этилацетатом (3 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость с желтоватым оттенком. Выход составил 468 мг (78%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ): 3.62 (6H, с,  $\text{CH}_3\text{OOC}$ ), 2.92 (4H, т,  $J = 6.9$  Гц,  $\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 2.72 (4H, т,  $J = 6.6$  Гц,  $\text{CH}_2\text{S}$ ).

Ди-(2,2,2-трифторэтил)овый эфир дитиодипропионовой кислоты (соединение 1h). Раствор дитиодипропионовой кислоты (400 мг, 1.90 ммоль) в 15 мл трифторэтанола и 100 мкл серной кислоты кипятили в течение 72 ч. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе хлористый метилен–метанол–уксусная кислота (30 : 1 : 0.1). После окончания реакции к смеси добавляли водный раствор аммиака до рН 8.0. Получившийся остаток экстрагировали этилацетатом (3 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость с желтоватым оттенком. Выход – 153 мг (21%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ) : 4.77 (4H, кв,  $J = 9.1$  Гц,  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OOC}$ ), 2.98–2.84 (8H, м,  $\text{CH}_2$ ).

Ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир дитиодипропионовой кислоты (соединение 1i). Раствор дитиодипропионовой кислоты (250 мг, 1.90 ммоль) в 5 мл трихлорэтанола и 50 мкл серной кислоты перемешивали при 140°C в течение 10 сут. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе хлористый метилен–метанол–уксусная кислота (30 : 1 : 0.1). Растворитель упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 0.1 М раствором NaOH (20 мл) и 0.1 М раствором соляной кислоты (2 × 20 мл). Органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали от растворителей на ротационном испарителе. Продукт представлял из себя прозрачное масло. Выход – 495 мг (88%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 4.79 (4H, с,  $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{OOC}$ ), 3.05–2.90 (8H, м,  $\text{CH}_2$ ).

**Синтез диалк(ен)илтиосульфидов.** Диметилтиосульфидат (DMTS; соединение 2a). К эмульсии диметилдисульфида (1 г, 10.6 ммоль) в 40 мл воды добавляли 30%-ный раствор перекиси водорода (1.08 мл, 10.6 ммоль) и перемешивали в течение 1 мес. до получения полностью гомогенного раствора. Реакционную массу экстрагировали хлористым метиленом (2 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над

сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость. Выход – 1.15 г (98%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : 3.03 (3H, с), 2.65 (3H, с).

Диэтилтиосульфидат (DETS; соединение 2b). К раствору диэтилдисульфида (1 г, 8.18 ммоль) в 10 мл муравьиной кислоты при 0°C медленно, по каплям добавляли 30%-ный раствор перекиси водорода (0.835 мл, 8.18 ммоль) в течение 20 мин и перемешивали 1.5 ч при 0°C. Далее реакционную массу экстрагировали хлористым метиленом (2 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт очищали методом колоночной хроматографии в системе *n*-гексан–этилацетат (8 : 1), целевые фракции упаривали от растворителей. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость. Выход – 0.735 г (65%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3.34 (2H, кв,  $J = 7.4$  Гц,  $\text{CH}_2\text{S(O)}$ ), 3.17 (2H, кв,  $J = 7.4$  Гц,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.48 (3H, т,  $J = 7.4$  Гц,  $\text{CH}_3$ ), 1.44 (3H, т,  $J = 7.4$  Гц,  $\text{CH}_3$ ).

Дипропилтиосульфидат (DPTS; соединение 2c). К раствору дипропилдисульфида (1 г, 6.65 ммоль) в 10 мл муравьиной кислоты при 0°C медленно, по каплям добавляли 30%-ный раствор перекиси водорода (0.679 мл, 6.65 ммоль) в течение 20 мин и перемешивали 4 ч при 0°C. Реакционную массу экстрагировали хлористым метиленом (2 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт очищали методом колоночной хроматографии в системе *n*-гексан–этилацетат (8 : 1), целевые фракции упаривали от растворителей. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость с желтоватым оттенком. Выход – 0.631 г (57%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ) : 3.17–3.07 (4H, м,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.81–1.67 (4H, м,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.44 (3H, т,  $J = 7.3$  Гц,  $\text{CH}_3$ ), 1.02 (3H, т,  $J = 7.4$  Гц,  $\text{CH}_3$ ).

Диаллилтиосульфидат (аллицин, DATS; соединение 2d). К раствору свежеперегнанного диаллилдисульфида (1 г, 6.84 ммоль) в 10 мл муравьиной кислоты при 0°C медленно, по каплям вносили 30%-ный водный раствор перекиси водорода (0.680 мл, 6.84 ммоль) в течение 20 мин и перемешивали 4 ч при 0°C. Реакционную массу экстрагировали хлористым метиленом (2 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт очищали методом колоночной хроматографии в системе *n*-гексан–этилацетат (10 : 1), целевые фракции упаривали от растворителей. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость с желтоватым оттенком. Выход – 0.632 г (53%).

$^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.89–5.66 (2H, м), 5.45–5.15 (4H, м), 3.79–3.67 (4H, м).

**Синтез диарилтиосульфидата.** 2,2'-[(тио)сульфинил]-бис-(пиридин-1-оксид) (соединение **2e**). К раствору 2,2'-дитиодипиридина (100 мг, 0.454 ммоль) в 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при  $-78^\circ\text{C}$  по каплям вносили раствор *m*-CPBA (763 мг, 1.362 ммоль) в 15 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  в течение 20 мин, смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 ч и далее при  $40^\circ\text{C}$  в течение 170 ч. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе гексан–этилацетат (4 : 1). К реакционной смеси добавляли 30 мл этилацетата, выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом ( $2 \times 10$  мл) и высушивали над оксидом фосфора. Продукт представлял собой белый аморфный порошок. Выход – 26 мг (21%). ИК-спектр ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3200–2600 (уш., ср.,  $\nu$   $\text{C}_{\text{гетаром.}}-\text{H}$ ), 1617, 1599, 1521, 1458 (ср.,  $\nu$   $\text{C}_{\text{гетаром.}}=\text{C}_{\text{гетаром.}}$ ) 1268, 1245, 1207 (в.,  $\nu$  C–N), 1149, 1040 (с.,  $\nu$  S–S=O), 769, 730 (ср.,  $\nu$  C–S=O), 672  $\text{cm}^{-1}$  (сл.,  $\nu$  C–S).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ): 8.7 (2H, д,  $J = 5.1$  Гц, N–CH), 8.51 (1H, дд,  $J = 1.5$  Гц,  $J = 7.8$  Гц, Ar–H), 8.50 (1H, дд,  $J = 1.5$  Гц,  $J = 7.8$  Гц, Ar–H), 8.15 (2H, д,  $J = 7.9$  Гц, N–CH), 7.96–7.91 (2H, м, Ar–H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\delta$ ): 157.64, 146.74, 143.16, 127.51, 123.95.

**Синтез тиосульфидатных производных диалкилкарбоксилатов.** 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовая кислота (соединение **2f**). К суспензии 3,3'-дитиодипропионовой кислоты (250 мг, 1.19 ммоль) в 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при  $-78^\circ\text{C}$  по каплям вводили раствор *m*-CPBA (267 мг, 1.19 ммоль) в 15 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  в течение 20 мин, смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе хлористый метилен–метанол–уксусная кислота (30 : 1 : 0.1). Растворители упаривали на ротационном испарителе, остаток еще раз упаривали с этанолом и высушивали в вакууме. Продукт очищали методом колоночной хроматографии в системе хлористый метилен–метанол–уксусная кислота (50 : 1 : 0.1), целевые фракции упаривали от растворителей. Продукт представлял собой белый порошок. Выход – 86 мг (32%). ИК-спектр ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3550–2500 (уш.,  $\nu$  COO–H), 1699 (с.,  $\nu$  C=O), 1432 (ср.,  $\delta_{\text{ас}}$  C–H), 1410, 1315, 1247, 1166, 1049 (ср.,  $\nu$  S–S=O), 720 (ср.,  $\nu$  C–S=O), 655 (сл.,  $\nu$  C–S).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ): 3.79 (2H, т,  $J = 7.1$  Гц,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 3.29 (2H, т,  $J = 6.8$  Гц,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 2.75 (2H, т,  $J = 6.8$  Гц,  $\text{CH}_2\text{S(O)}$ ), 2.72 (2H, т,  $J = 7.1$  Гц,  $\text{CH}_2\text{S}$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\delta$ ): 172.90, 171.53, 56.81, 34.42, 31.30, 28.95.

**Диметиловый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты** (соединение **2g**). К раствору диметилдитиодипропионата (455 мг, 1.91 ммоль) в 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при  $-78^\circ\text{C}$  по каплям

добавляли раствор *m*-CPBA (427 мг, 1.91 ммоль) в 15 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  в течение 20 мин, смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ в системе гексан–этилацетат (4 : 1). Через 170 ч растворитель упаривали, продукт очищали методом флеш-хроматографии в градиенте гексан–этилацетат (5 : 1) → этилацетат. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость с желтоватым оттенком. Выход – 68 мг (14%). ИК-спектр ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2999 (уш., сл.,  $\nu$  C–H ( $\text{CH}_2$ )), 2955 (ср.,  $\nu$  C–H ( $\text{CH}_3$ )), 1737 (с.,  $\nu$  C=O), 1438 (ср.,  $\delta_{\text{ас}}$  C–H), 1418, 1362, 1227–1178 (уш., с.,  $\nu$  C–O), 1049 (с.,  $\nu$  S–S=O), 672 (сл.,  $\nu$  C–S).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ): 3.64 (3H, с,  $\text{CH}_3\text{OOC}$ ), 3.63 (3H, с,  $\text{CH}_3\text{OOC}$ ), 3.50–3.30 (4H, м,  $\text{CH}_2\text{COOMe}$ ), 2.83–2.77 (4H, м,  $\text{CH}_2\text{S}$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\delta$ ): 171.80, 171.70, 52.31, 52.07, 50.60, 35.61, 27.80, 27.68.

**Ди-(2,2,2-трифторэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты** (соединение **2h**). К раствору ди-(2,2,2-трифторэтил)-3,3'-дитиодипропионата (153 мг, 0.41 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при  $-78^\circ\text{C}$  по каплям добавляли раствор *m*-CPBA (92 мг, 0.41 ммоль) в 15 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  в течение 20 мин, смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе гексан–этилацетат (2 : 1). Продукт очищали методом флеш-хроматографии в градиенте гексан–этилацетат (5 : 1) → этилацетат, высушивали от растворителей на ротационном испарителе и получали соединение **2h** в виде прозрачной вязкой жидкости с желтоватым оттенком. Выход – 59 мг (37%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ ): 4.77 (2H, кв,  $J = 9.1$  Гц,  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OOC}$ ), 4.76 (2H, кв,  $J = 9.1$  Гц,  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OOC}$ ), 3.55–3.36 (4H, м,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ ), 2.97–2.91 (4H, м,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.83–2.77 (4H, м,  $\text{CH}_2\text{S}$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150.7 МГц,  $\delta$ ): 170.17 ( $2 \times$  с), 123.90 ( $2 \times$  кв,  $J = 279$  Гц), 60.35 ( $2 \times$  кв,  $J = 35$  Гц), 50.26, 35.34, 27.58, 27.50.  $^{19}\text{F}$  ЯМР (563.9 МГц,  $\delta$ ): –72.29 ( $2 \times$  т,  $J = 11.3$  Гц).

**Ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты** (соединение **2i**). К раствору 2,2,2-трихлорэтилдитиодипропионата (905 мг, 1.913 ммоль) в 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при  $-78^\circ\text{C}$  по каплям вносили раствор *m*-CPBA (432 мг, 1.913 ммоль) в 15 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  в течение 20 мин, смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 ч и затем 48 ч при комнатной температуре. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе гексан–этилацетат (4 : 1). Продукт очищали методом колоночной хроматографии в градиенте гексан–этилацетат (10 : 1) → (4 : 1) и получали соединение **2i** в виде прозрачного масла. Выход – 168 мг (18%). ИК-спектр ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3009 (сл.,  $\nu$  C–H ( $\text{CH}_2\text{CCl}_3$ )), 2959, 2943, 2928 (сл.,  $\nu$  C–H), 1761 (с.,  $\nu$  C=O), 1429, 1405, 1379 (ср.,  $\delta_{\text{ас}}$  C–H), 1272, 1207–1137

(уш., с.,  $\nu$  C–O), 1073 (с.,  $\nu$  S–S=O), 846, 797 (ср.,  $\nu$  C–Cl), 717 (ср.,  $\nu$  C–S=O), 650 (сл.,  $\nu$  C–S).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ , ацетон- $d_6$ ): 4.90 (2H, с,  $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{OOC}$ ), 4.89 (2H, с,  $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{OOC}$ ), 3.60–3.40 (4H, м,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ ), 3.15–2.95 (4H, м,  $\text{CH}_2\text{S}$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\delta$ ): 170.06, 170.00, 95.58, 95.52, 73.97, 73.80, 50.27, 35.62, 27.73, 27.59.

**Определение минимальных ингибирующих концентраций тиосульфидов.** Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) определяли методом двукратных серийных разведений согласно CLSI M27-A3 [18] и M07-A11 [19] в трех независимых экспериментах с тремя повторами в каждом. В качестве положительно го контроля в случае *S. albicans* использовали флуконазол, для *S. aureus* – ванкомицин. Стоко вый раствор аллицина готовили в ДМСО в концентрации 6400 мкг/мл; для остальных веществ – в стерильной воде в концентрации 1280 мкг/мл. Стоковые растворы препаратов разбавляли до конечных концентраций в среде для анализа и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов, после чего добавляли по 100 мкл инокулята. Ряды 11 и 12 оставляли для отрицательного контроля (среда с инокуля том без препарата) и контроля стерильности. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 35°C для *S. albicans* и при 37°C для *S. aureus*. Тестируемый диапазон концентра ций для флуконазола и соединений **2a**, **2d**, **2h**, **2g**, **2f** составлял от 0.125 до 64 мкг/мл; для ванкомицина и соединений **2b**, **2c**, **2e**, **2i** – от 0.0625 до 32 мкг/мл. Значение МПК определяли спектрофотометрически. За МПК принимали наименьшую концентрацию препарата,

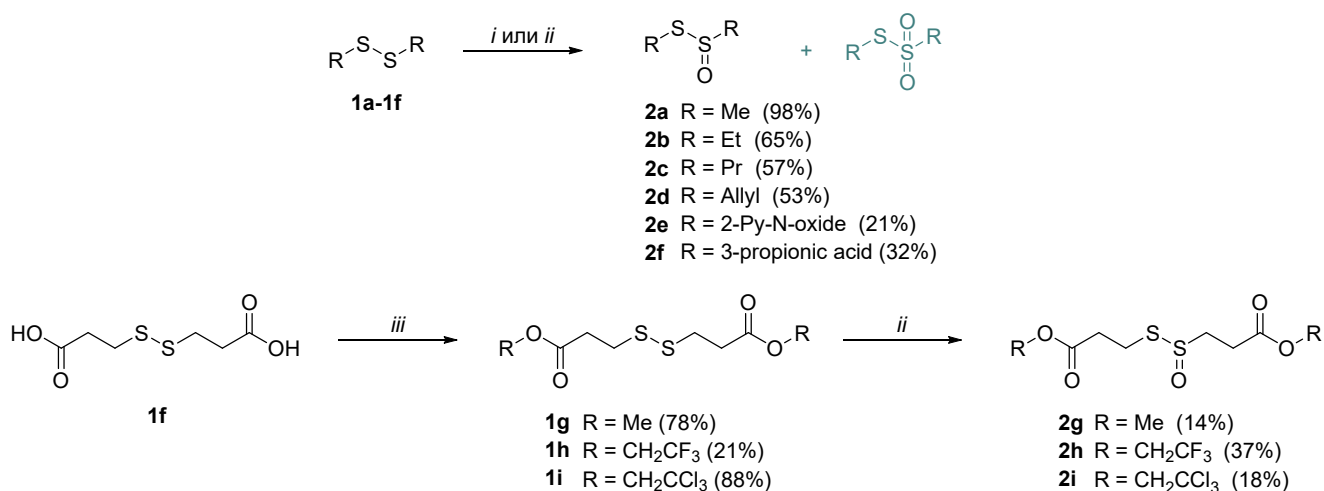
вызывающую значительное (~80% для флу коназола) или полное (все другие препараты) подавление роста микроорганизма по сравне нию с контролем.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Синтез природных тиосульфидов и их аналогов: арилтиосульфидов и тиосульфидных производных диалкилдикарбоксилатов

Природный компонент аллицин обладает широким спектром противомикробного дей ствия, но при этом имеет низкую стабиль ность [14]. Его аналоги, например диметил тиосульфид, механизм действия которого аналогичен аллицину, более стабильны. В ходе работы были получены как природные ал кил-аналоги аллицина (**2a–2c**), действующие одновременно против патогенных грибов и бактерий, так и синтезированы новые тио сульфидные производные (**2e–2i**) аллицина (рис. 1) с замещенными фрагментами алкил карбоксилатов и их эфиров, а также остатком пиридин-N-оксида. Последнее производное относится к привилегированной структуре в медицинской химии [20] и служит мимети ком малоизученного противомикробного ком понента лука (*Allium stipitatum*) – 2-(метилди тио)пиридин-3-карбонитрила [21].

К основным методам получения алифати ческих тиосульфидов относится воздействие смеси 30%-ного раствора перекиси водоро да и муравьиной кислоты на дисульфид [14, 22, 23]. В результате в реакционной смеси *in situ* ге-



**Рис. 1.** Схема синтеза тиосульфидов. Реагенты и общие условия: (i)  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HCOOH}$ , 0°C; (ii) *m*-CPBA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$ ; (iii) ROH, кипячение,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . В скобках указан выход продукта. Обозначения: Me – метильная группа, Et – этильная группа, Pr – пропильная группа, Allyl – аллильная группа, Py-N-oxide – пиридин-N-оксид, propionic acid – пропионовая кислота.

нерируется пермуравьиная кислота, которая и действует как окислитель на дисульфидную связь. В качестве альтернативного окислителя применяют *meta*-хлорпербензойную кислоту (*m*-CPBA) [22]. Оба метода требуют поддержания низких температур: 0–4°C в случае перекиси водорода и –78°C в случае *m*-CPBA. Однако даже при соблюдении заданного температурного режима происходит образование побочных продуктов – сульфонов. Именно поэтому для выделения каждого из продуктов **2a–2i** пришлось вводить стадию очистки с использованием колоночной хроматографии.

В случае диалкилдикарбоксилатов и их производных (**1f–1i**) было обнаружено, что при “мягком” окислении, под действием 30%-ного раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и муравьиной кислоты, образуются лишь следовые количества продуктов. Вероятно, это вызвано сильным электроноакцепторным влиянием карбоксильных заместителей, которые приводят к электронодефицитному состоянию атомов серы. В связи с этим мы применили более “жесткий” окислитель — *m*-CPBA — и повысили температурный режим реакции. В таких условиях образовался как целевой продукт, так и значительное количество сульфона.

Синтез соединений **1g** и **1h** выполняли при кипячении соответствующего спирта с дикислотой **1f** в присутствии каталитических количеств серной кислоты. В случае соединения **1i** реакцию проводили при 140°C — чтобы избежать разложения 2,2,2-трихлорэтанола. Выбор галогенсодержащих спиртов в роли заместителей был проведен на основании теоретического анализа стабильности образуемых ими дисульфидов и соответствующих тиосульфидов. Кроме того, при разложении 2,2,2-трифторэтил- и 2,2,2-трихлорэтилкарбоксилатов ожидали образования менее токсичных и хорошо экскретируемых из организма продуктов по сравнению с другими вариантами замещенных галогенэфиров [24].

Синтезированные соединения охарактеризованы физико-химическими методами анализа, для ранее описанных тиосульфидов **2a–2d** данные соответствовали ранее опубликованным [17].

*Противомикробная активность  
диалк(ен)илтиосульфидов и их аналогов  
в отношении культур C. albicans ATCC10231  
и S. aureus ATCC29213 и ATCC43300*

Для оценки противомикробной активности диалк(ен)илтиосульфидов, диарилтиосульфидов и тиосульфидных производных диалкилдикарбоксилатов в отношении *C. albicans* и *S. aureus* использовали метод серийных разведений с определением величины МПК для каждого соединения. Анализ проводили на контрольных штаммах: *C. albicans* ATCC10231 и *S. aureus* ATCC29213, — рекомендованных для

использования в лабораторных исследованиях. Также действие соединений было проверено на устойчивом к метициллину и оксациллину штамме *S. aureus* ATCC43300.

Диэтилтиосульфидат (**2b**) и дипропилтиосульфидат (**2c**) в отношении штаммов *S. aureus* ATCC29213 и ATCC43300 оказались одинаково малоэффективны (МПК ~200 мкМ, табл. 1). Чувствительность *S. aureus* к действию диметилтиосульфидата (**2a**) для штамма ATCC29213 (МПК 272 мкМ) снизилась более чем на 30%, по сравнению с действием диэтилтиосульфидата и дипропилтиосульфидата. Диметилтиосульфидат оказался неэффективен в отношении MRSA штамма ATCC (МПК 435 мкМ). Оба штамма *S. aureus* также были нечувствительны к действию алицина (**2d**) в диапазоне тестируемых концентраций (МПК > 400 мкМ). Высокие значения МПК для этого соединения соответствовали ранее полученным A. Muller и др. [13] для штаммов *S. aureus* ATCC DSM 20231 и ATCC43300. Авторами этой работы было показано, что алицин действует на культуру *C. albicans*, причем для штамма DSM 1386 значение МПК было в два раза ниже (196 мкМ) полученного для алицина на клетках *S. aureus*. Ранее мы определили, что значения МПК для диалк(ен)илтиосульфидатов в отношении штамма *C. albicans* ATCC10231 находятся в пределах 4.1–20 мкМ [17]. Эти величины почти на два порядка меньше, чем МПК для штаммов стафилококка (табл. 1).

Таким образом, бактерии *S. aureus* менее чувствительны к действию диалк(ен)илтиосульфидатов, чем грибы *C. albicans*. Это коррелирует с данными исследования по изучению противомикробных свойств аналогичных соединений в отношении грамположительных бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Micrococcus luteus*) и дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae*. В этой работе R. Leontiev с соавт. [14] показали, что противогрибковая активность диалк(ен)илтиосульфидатов выше, чем антибактериальная. По приведенным в табл. 1 данным видно, что из всех исследованных нами диалк(ен)илтиосульфидатов максимальной противомикробной активностью обладает дипропилтиосульфидат (**2c**).

Значения МПК для серии синтетических аналогов тиосульфидатов: диарилтиосульфидата и тиосульфидных производных диалкилдикарбоксилатов — находились в диапазоне концентраций от 2.78 до более 282 мкМ (табл. 1). Показано, что 2,2'-[(тио)сульфинил]-бис-(пиридин-1-оксид) (**2e**) и 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовая кислота (**2f**) не оказывали ингибирующего действия ни на грибы, ни на бактерии в терапевтически значимых концентрациях (МПК > 100 мкМ).

**Таблица 1.** Значения МПК для синтетических тиосульфидов и коммерческих антимикробных препаратов в отношении *C. albicans* и *S. aureus*

Соединение	МПК <sup>a</sup>					
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>S. aureus</i> ATCC 43300	
	мкг/мл	мкМ	мкг/мл	мкМ	мкг/мл	мкМ
<b>2a</b> (DMTS)	2.68 ± 0.57	24.32 ± 5.17 <sup>b</sup>	30.0 ± 4.73	272.2 ± 42.9	48.0 ± 14.3	435.6 ± 129.8
<b>2b</b> (DETS)	0.72 ± 0.16 <sup>b</sup>	5.21 ± 1.15 <sup>b</sup>	≥32.0	≥231.4	≥32.0	≥231.4
<b>2c</b> (DPTS)	0.69 ± 0.26 <sup>b</sup>	4.15 ± 1.54 <sup>b</sup>	≥32.0	≥192.4	≥32.0	≥192.4
<b>2d</b> (DATS)	3.31 ± 1.10 <sup>b</sup>	20.39 ± 6.65 <sup>b</sup>	>64	>394.3	>64	>394.3
<b>2e</b>	>32	>119.3	>32	>119.3	>32	>119.3
<b>2f</b>	>64	>282.8	>64	>282.8	>64	>282.8
<b>2g</b>	5.44 ± 1.16	21.39 ± 4.56	>64	>251.7	>64	>251.7
<b>2h</b>	2.24 ± 0.50	5.74 ± 1.28	>64	>164.0	>64	>164.0
<b>2i</b>	1.36 ± 0.23	2.78 ± 0.47	6.50 ± 1.73	13.29 ± 3.54	10.0 ± 5.36	20.45 ± 10.96
Флуконазол	0.85 ± 0.17	2.76 ± 0.56	н/о <sup>c</sup>			
Ванкомицин	н/о		1.86 ± 0.35	1.28 ± 0.24	2.5 ± 0.77	1.72 ± 0.53

<sup>a</sup>Результаты представлены как среднее ± 95%-ный доверительный интервал.

<sup>b</sup>Приведены данные из работы [17, Creative Common CC BY license].

<sup>c</sup>Не определяли.

В то же время более липофильные эфиры, такие как диметилловый (**2g**), ди-(2,2,2-трифторэтил)овый (**2h**) и ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты (**2i**), проявляли выраженную антиканцерогенную активность (МПК 2.78–21 мкМ), что, по всей видимости, связано с их лучшей проницаемостью мембран патогенов по сравнению с отрицательно заряженной кислотой **2f**. Наиболее универсальным противомикробным препаратом, действующим как на грибы, так и на бактериальные клетки, оказалось соединение **2i** – ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты (МПК 2.78–20 мкМ). Низкие значения МПК, сравнимые с таковыми для известных коммерческих противогрибковых и антибактериальных препаратов, позволяют рассматривать соединение **2i** как перспективное для использования в клинической практике.

Таким образом, синтезирован ряд природных диалк(ен)илтиосульфидов и их новых синтетических аналогов и оценена их антибактериальная и антимикотическая активность на клинически значимых патогенах: бактериях *S. aureus* и грибах *C. albicans*. Показано, что некоторые соединения этого класса облада-

ют выраженными противогрибковыми свойствами, эффективно подавляя рост *C. albicans* в концентрациях до 10 мкМ. Среди всех полученных соединений ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты (**2i**) оказывал наиболее выраженное противомикробное действие как на штаммы *S. aureus* (МПК 13–20 мкМ), так и на *C. albicans* (МПК 2.78 мкМ), которое сравнимо с применяемыми лекарственными средствами. Это позволяет рассматривать соединение **2i** в качестве перспективного кандидата в противомикробные препараты. Полученные результаты формируют основу для создания новых универсальных лекарственных средств против полимикробных инфекций, при терапии которых имеющиеся в арсенале коммерческие препараты могут быть малоэффективны и/или требуют использования высоких терапевтических доз.

Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда (грант № 23-24-00151).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108.
- Nobile C.J., Johnson A.D. (2015) *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 71–92.
- Wolcott R., Costerton J.W., Raoult D., Culter S.J. (2013) The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, 107–112.
- Goetghebeur M., Landry P.A., Han D., Vicente C. (2007) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a public health issue with economic consequences. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **18**, 27–34.
- Silva-Santana G., Lenzi-Almeida K.C., Lopes V.G.S., Aguiar-Alves F. (2016) Biofilm formation in catheter-related infections by panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *Int. Microbiol.* **19**, 199–207.
- Peters B.M., Jabra-Rizk M.A., O'May G.A., Costerton J.W., Shirtliff M.E. (2012) Polymicrobial interactions in biofilms: impact on pathogenesis and human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 193–213.
- Klotz S.A., Chasin B.S., Powell B., Gaur N.K., Lipke P.N. (2007) Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **59**, 401–406.
- Pfaller M.A., Diekema D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 133–163.
- Harriott M.M., Noverr M.C. (2010) Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3746–3755.
- Lebeaux D., Ghigo J.M., Beloin C. (2014) Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 510–543.
- Borlinghaus J., Albrecht F., Gruhlke M.C.H., Nwachukwu I.D., Slusarenko A.J. (2014) Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules.* **19**, 12591–12618.
- Sharifi-Rad J., Hoseini Alfatemi S., Sharifi Rad M., Iriti M. (2014) Antimicrobial synergic effect of allicin and silver nanoparticles on skin infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* spp. *Ann. Med. Health Sci. Res.* **4**(6), 863–868.
- Muller A., Eller J., Albrecht F., Prochnow P., Kuhlmann K., Bandow J.E., Slusarenko A.J., Leichert L.I.O. (2016) Allicin induces thiol stress in bacteria through S-allylmercapto modification of protein systems. *J. Biol. Chem.* **291**, 11477–11490.
- Leontiev R., Hohaus N., Jacob C., Gruhlke M.C.H., Slusarenko A.J. (2018) A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. *Sci. Rep.* **8**, 6763.
- Revtovich S., Morozova E., Kulikova V., Koval V., Anufrieva N., Nikulin A., Demidkina T. (2020) Sulfoxides of sulfur-containing amino acids are suicide substrates of *Citrobacter freundii* methionine  $\gamma$ -lyase. Structural bases of the enzyme inactivation. *Biochimie.* **168**, 190–197.
- Anufrieva N.V., Morozova E.A., Kulikova V.V., Bazhulina N.P., Manukhov I.V., Degtev D.I., Gnuchikh E.Y., Rodionov A.N., Zavilgelsky G.B., Demidkina T.V. (2015) Sulfoxides, analogues of L-methionine and L-cysteine as pro-drugs against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Naturae.* **7**(27), 128–135.
- Revtovich S., Lyfenko A., Tkachev Y., Kulikova V., Koval V., Puchkov V., Anufrieva N., Solyev P., Morozova E. (2023) Anticandidal activity of *in situ* methionine  $\gamma$ -lyase-based thiosulfinate generation system vs. synthetic thiosulfates. *Pharmaceuticals.* **16**(12), 1695.
- (2008) M27-A3 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. (2008) *National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Wayne PA.* **28**(14). [https://clsi.org/media/1461/m27a3\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf)
- (2018) M07-A11 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA.* 11<sup>th</sup> edition. **38**(2). [https://clsi.org/media/1928/m07ed11\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf)
- Marinescu M., Popa C.V. (2022) Pyridine compounds with antimicrobial and antiviral activities. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(10), 5659.
- Karunanidhi A., Ghaznavi-Rad E., Jeevajothi Nathan J., Joseph N., Chigurupati S., Mohd Fauzi F., Pichika M.R., Hamat R.A., Lung L.T.T., van Belkum A., Neela V. (2019) Bioactive 2-(methylidithio)pyridine-3-carbonitrile from persian shallot (*Allium stipitatum* Regel.) exerts broad-spectrum antimicrobial activity. *Molecules.* **24**(6), 1003.
- Roseblade A., Ung A., Bebawy M. (2017) Synthesis and *in vitro* biological evaluation of thiosulfinate derivatives for the treatment of human multidrug-resistant breast cancer. *Acta Pharm. Sinica.* **38**(10), 1353–1368.
- Stellenboom N., Hunter R., Cairn M.R., Bourne S.A., Cele, K. Qwebani T., le Roex T. (2007) Synthesis and inclusion of S-aryl alkylthiosulfates as stable allicin mimics. *ARKIVOC.* **9**, 53–63.
- Mehendale H.M. (2010) 7.19 – Halogenated hydrocarbons. In: *Comprehensive Toxicology*, 2<sup>nd</sup> edition, vol. 7. Ed. McQueen C.A. Elsevier, pp. 459–474. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00824-1>



## Synthesis and Antimicrobial Activity of Thiosulfinates, Allicin Analogues

V. M. Puchkov<sup>1</sup>, A. D. Lyfenko<sup>1</sup>, V. S. Koval<sup>1</sup>, S. V. Revtovich<sup>1</sup>, V. V. Kulikova<sup>1</sup>,  
N. V. Anufrieva<sup>1</sup>, A. S. Zemskaya<sup>1</sup>, E. A. Morozova<sup>1, \*</sup>, P. N. Solyev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: elmorozova@yahoo.com

Diallyl thiosulfinate (allicin) effectively inhibits the growth of various microorganisms, including antibiotic-resistant strains, so it can be considered a broad-spectrum antimicrobial compound. However, its instability in the bloodstream hinders its use as a therapeutic agent. We have synthesized a number of allicin analogues, both natural and synthetic, and evaluated *in vitro* their antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The synthesized compounds were shown to exhibit more pronounced antifungal activity than antibacterial one. Among the compounds obtained, synthetic di-(2,2,2-trichloroethyl) ester of 3,3'-[(thio)sulfinyl]dipropionic acid effectively inhibited the growth of both fungi and bacteria at concentrations comparable to those of known antimicrobial agents used in medical practice.

**Keywords:** allicin, thiosulfinates, antimicrobial activity, polymicrobial infection, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*